

Chemische
Oestrogen-Bestimmungsmethoden
und ihre klinische Brauchbarkeit

Rüdiger Gamisch

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777

AUS DER I. FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. BICKENBACH

CHEMISCHE OESTROGEN - BESTIMMUNGSMETHODEN
UND IHRE KLINISCHE BRAUCHBARKEIT

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München



vorgelegt von
Rüdiger Gamisch
aus
Kaaden/CSR

München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. WAGNER
Mitberichterstatter: Professor Dr. W. BICKENBACH
Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 17. III. 1959

I. Die Frage der richtigen Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	1-2
II. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	3-4
III. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	5-6
IV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	7-8
V. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	9-10
MEINER LIEBEN MUTTER IN DANKBARKEIT GEWIDMET	
VI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	11-12
VII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	13-14
VIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	15-16
IX. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	17-18
X. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	19-20
XI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	21-22
XII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	23-24
XIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	25-26
XIV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	27-28
XV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	29-30
XVI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	31-32
XVII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	33-34
XVIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	35-36
XIX. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	37-38
XX. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	39-40
XXI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	41-42
XXII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	43-44
XXIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	45-46
XXIV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	47-48
XXV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	49-50
XXVI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	51-52
XXVII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	53-54
XXVIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	55-56
XXIX. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	57-58
XXX. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	59-60
XXXI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	61-62
XXXII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	63-64
XXXIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	65-66
XXXIV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	67-68
XXXV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	69-70
XXXVI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	71-72
XXXVII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	73-74
XXXVIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	75-76
XXXIX. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	77-78
XL. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	79-80
XLI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	81-82
XLII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	83-84
XLIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	85-86
XLIV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	87-88
XLV. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	89-90
XLVI. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	91-92
XLVII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	93-94
XLVIII. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	95-96
XLIX. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	97-98
L. Die Darstellung der Welt als eines einheitlichen Ganzen	99-100

ÜBERSICHT

	<u>Seite</u>
I.) Die Frage der klinischen Brauchbarkeit von chemischen Oestrogen-Bestimmungen	5- 6
II.) Die chemische Extraktion der Oestrogene und ein Vergleich der Vor- und Nachteile zu den biologischen Methoden	7- 8
III.) Chemische Bestimmungsmethoden, welche für die klinische Oestrogenbestimmung am geeignetsten erscheinen	
A) Bisher entwickelte chemische Bestimmungsmethoden	9-10
B) Auswahl für die Klinik geeignet erscheinender Methoden	
1.) Bestimmungsmethode nach KELLER	11
2.) Bestimmungsmethode für Oestron nach GIRARD	12
3.) Methode zur Trennung von Alpha- u. Beta-Oestradiol nach UMBERGER u. CURTIS	13
IV.) Eigene Untersuchungen über klinische Brauchbarkeit	
A) Nachprüfung von Ergebnissen über photometrisches Verhalten der Oestrogen-Reinsubstanzen sowie der Urochrome	14-20
1.) Lichtabsorption der Oestrogen-Reinsubstanzen und deren Abhängigkeit	14-20
2.) Bestimmung von Oestrogen-Reinsubstanz-Gemischen	20-22
3.) Untersuchung der Extraktverunreinigungen (Urochrome) an hormonfreien Extrakten	22-26
B) Untersuchung der drei ausgewählten Methoden	
1.) Prüfung der Methoden an bekannten Mengen Reinsubstanzen (Modellversuch)	27
2.) Prüfung durch Parallelversuche	27
3.) Prüfung durch Wiedergewinnung bekannter Oestrogen-Reinsubstanzen aus Leerurin	28
C) Kombination der drei Methoden für die Einzelbestimmung der Oestrogene aus ihren Mischungen	
1.) Modifizierung der Methode nach GIRARD	29
2.) Hintereinanderschaltung der drei Methoden	31
3.) Prüfung der kombinierten Methode	32
D) Prüfungsergebnisse	
1.) Verlust und Fehlerbreite der einzelnen Methoden	33
2.) Fehlerquellen	33
3.) Zeitverbrauch und Schwierigkeitsgrad	34
4.) Kostenaufwand bei den einzelnen Methoden	34
Zusammenfassung	36
Schrifttum	38

I.) DIE FRAGE DER KLINISCHEN BRAUCHBARKEIT VON CHEMISCHEN OESTROGEN-BESTIMMUNGEN

Das Kapitel der Oestrogene oder Follikelhormone, wie man einen Teil der weiblichen Sexualhormone auch nennt, nimmt in der Endokrinologie, der Lehre von der inneren Sekretion, einen nicht unbedeutenden Platz ein. Für die Erforschung hormoneller Zusammenhänge stellt die Erfassung und Bestimmung der Hormone, in unserem Fall der Oestrogene, eine wichtiges Teilgebiet dar.

Man unterscheidet vier verschiedene Oestrogene und zwar

Oestron,
Oestriol,
Alpha-Oestradiol und
Beta-Oestradiol.

Es sind Steranabkömmlinge, die sich chemisch durch verschiedene Radikale bzw. deren Stellung am Steranring unterscheiden.

Die einzelnen Oestrogene haben in tierischen Organismen der Wirbeltiere spezifische Wirkung, d.h., sie rufen in bestimmten Organismen bestimmte Veränderungen hervor. Die Hauptwirkung der Oestrogene richtet sich auf die Geschlechtsausbildung und Geschlechtsfunktion. Diese spezifische Wirkung wurde zur Oestrogenbestimmung bei biologischen Testen (Tierversuchen) herangezogen.

Mit der Entwicklung brauchbarer optischer und messtechnischer Apparaturen und der Entdeckung einer spezifischen Oestrogenreaktion ist die chemische Bestimmung der Oestrogene in Angriff genommen worden.

Zahlreiche chemische Methoden wurden entwickelt, die sich das verschiedene chemische Verhalten der Oestrogene zunutze machten. Mit Hilfe dieser Methoden sind bereits zahlreiche Ergebnisse der Oestrogenproduktion unter normalen und anormalen Bedingungen erarbeitet worden.

In der letzten Zeit mehren sich kritische Stimmen zur Frage der Brauchbarkeit der Methoden, speziell über die Möglichkeit zur klinischen Anwendung. Besondere Kritik findet der Zeit- und Arbeitsaufwand und die damit verbundene grosse Kostspieligkeit der Methoden bei einem sehr umstrittenen Wert und einer grossen Ungenauigkeit der Einzel-Ergebnisse.

Das Ziel der Arbeit war, nicht eine chemische Extraktionsmethode für klinische Untersuchungen anzuwenden, sondern man wollte sich vom Standpunkt des Nichtchemikers aus über die klinische Brauchbarkeit einiger geeignet erscheinender chemischer Bestimmungsme-

thoden mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln informieren. Und zwar kam es speziell darauf an, Aufschluss über Zuverlässigkeit, Brauchbarkeit, Irrtumsmöglichkeiten und Fehlergrößen zu erhalten, indem man die Methoden an bekannten Mengen Reinsubstanzen nachprüfte, um eine einfache und genügend genaue chemische Oestrogen-Bestimmungsmethode zu finden, die sich klinisch leicht durchführen lässt.

Darüber hinaus sollte versucht werden, durch Kombination geeigneter Methoden einen Weg zur Trennung der 4 Oestrogene bei gleichzeitiger quantitativer Bestimmungsmöglichkeit zu finden.

II.) DIE CHEMISCHE EXTRAKTION DER OESTROGENE UND EIN VERGLEICH DER VOR- UND NACHTEILE ZU DEN BIOLOGISCHEN METHODEN

1.) Wesen der chemischen Bestimmungsmethoden

Die zur Untersuchung verwendete Körperflüssigkeit, aus der die Extraktion der Oestrogene erfolgt, ist wegen der leichten Zugänglichkeit bei den meisten Methoden der Harn. Die Oestrogene werden im Körper mit Schwefelsäure und Zuckersäure gepaart, werden dadurch wasserlöslich und kommen durch die Niere zur Ausscheidung. Um die reinen Oestrogene zu erhalten, müssen diese Verbindungen wieder gespalten werden. Dies geschieht mittels Hydrolyse. (Im allgemeinen wird die Säurehydrolyse angewandt und zwar speziell mit Salzsäure.)

Auf Grund physikalischer und chemischer Eigenschaften werden dann mit den entsprechenden Lösungsmitteln die Oestrogene aus der Untersuchungsflüssigkeit herausgezogen und nach Reinigung und Abdampfung der Lösungsmittel im Extrakt gewonnen.

Da die mengenmässige Ausscheidung der Oestrogene im Harn sehr gering ist, ist eine besondere Art der Messtechnik erforderlich. Die Oestrogene werden mit verschiedenen Mitteln gefärbt und das verschiedenartige optische Verhalten dieser spezifischen Farblösungen wird bei den meisten Methoden zur Oestrogenbestimmung herangezogen.

2.) Gegenüberstellung der Vorzüge der chemischen und der biologischen Bestimmungsmethoden

Als Vorteile der chemischen Bestimmungsmethoden sind zu nennen die Möglichkeit der genaueren Quantitätsbestimmung sowie die Möglichkeit zur Bestimmung der einzelnen Oestrogene und die damit verbundene grössere Spezifität gegenüber den Tierversuchen; ferner die Zuverlässigkeit chemischer Methoden und die geringere Versuchsdauer (6 - 8 Std., bei biologischen Testen oft 2 - 3 Tage).

In Beziehung auf die chemischen Methoden sind als Vorteile für biologische Methoden in erster Linie der geringe Aufwand an Arbeit bzw. Zeit, welche zum Ansetzen der Versuche (Entnahme, Präparation, Injektion der zu untersuchenden Körperflüssigkeit und Ablesung) notwendig ist, sowie der sich durch einen geringen Materialverbrauch ergebende niedere Kostenaufwand zu nennen. Ferner ist der Schwierigkeitsgrad weitaus geringer als bei den chemischen Methoden und es sind ausserdem nur wenige, in jedem Labor vorhandene technische Voraussetzungen erforderlich. Langwierige Reinigungsverfahren wie bei den chemischen Methoden fallen weg.

3.) Gegenüberstellung der Nachteile der chemischen und der biologischen Bestimmungsmethoden.

Nachteilig für die chemischen Oestrogen-Bestimmungsmethoden ist die Störung, welche durch Verunreinigungen (Urochrome) entstehen. Diese lassen keine genauen Messungen zu, beeinflussen die Hormone (im allgemeinen im Sinne einer Lichtabsorptionserniedrigung - Quenchingeffekt), sind in allen Extrakten vorhanden und lassen sich kaum beseitigen. Die chemischen Methoden sind gegenüber den biologischen weniger empfindlich, da die Veränderungen im tierischen Organismus das Vorhandensein kleinster Oestrogenmengen deutlicher erkennen lassen. Die chemischen Methoden sind in ihren technischen Ausführungen mit grossen Schwierigkeiten verbunden und es ist als technische Voraussetzung ein gut eingerichtetes Laboratorium erforderlich. Ferner wirkt sich bei den chemischen Methoden der grosse Materialverbrauch (durch teure Chemikalien) und der hohe Arbeitsaufwand aus, die eine grosse Kostspieligkeit der Methoden verursachen.

Nachteile bei den biologischen Testmethoden ergeben sich aus einer gewissen Umständlichkeit, die die Tierhaltung, Tiervorbereitung (Kastration) und Ablesen des Ergebnisses durch Tötung des Tieres mit sich bringt.

Ausserdem ist die Zeitdauer, die man von Ansetzen des Versuches bis zur Ablesung verstreichen lassen muss, wesentlich grösser als bei den chemischen Testmethoden. Weiter sei erwähnt, dass die Quantitätsbestimmung nur annähernde Werte bringt und dass Ungenauigkeiten durch Versager (Sterben der Tiere nach Injektion, usw.) auftreten können.

III.) CHEMISCHE BESTIMMUNGSMETHODEN, WELCHE FÜR DIE KLINISCHE OESTROGENBESTIMMUNG AM GEEIGNETSTEN ERSCHEINEN

A) Bisher entwickelte chemische Bestimmungsmethoden

1.) Allgemeine Vorbemerkung

Es gibt noch keine chemische Bestimmungsmethode, die einen einwandfreien, schnellen u. in der Klinik leicht durchführbaren Nachweis der Oestrogene ermöglicht und es sind deshalb viele Versuche unternommen worden, einen geeigneten Weg zur Oestrogenbestimmung zu finden unter Verwendung der verschiedenen chemischen und physikalischen Verhaltungsweisen der Oestrogene.

2.) Das Gemeinsame der Methoden

Allen chemischen Bestimmungsmethoden geht das Hydrolysierungs-, Extraktions- und Reinigungsverfahren voraus. Je nach Methode werden sie modifiziert hinsichtlich Zeitdauer, Art und Menge der verwendeten Mittel.

3.) Das Besondere der einzelnen Methoden

Das Besondere bei den einzelnen Methoden beruht letztlich in der Bestimmungsart der Oestrogene aufgrund ihrer verschiedenartigen Verhaltungsweisen und der dazu erforderlichen Schritte, sowie zusätzliche Reinigungsverfahren.

Wegen der geringen Mengen beschränkt sich die Bestimmung auf gewisse färb- u. messtechnische Verfahren.

Die photometrische Messung, die mit Hilfe der Lichtabsorption von Farblösungen die darin enthaltene Stoffmenge bestimmt, wird angewendet bei den Methoden nach BANES, OBERSTE/LEHN, STIMMEL, BREITNER, ALLEN. Diese Art der Bestimmung wurde auch in dieser Arbeit angewandt.

Die bei der Schwefelsäure-Färbung auftretende Fluoreszenz findet Verwendung bei den Methoden nach GARST/NYC/MARON/FRIEDGOOD, BATES/COHEN, FINKELSTEIN, SLOWWITHE/EKMAN/ENGEL/NATHANSON/PINCUS/CARLO und JAILER.

Daneben existieren Methoden, die sich das chromatographische Verhalten der Oestrogene zunutze machen: GARST/NYC/MARON/FRIEDGOOD, HEFTMANN!

Das Verhalten der Oestrogen-Farblösung in polarisiertem Licht gebraucht die Methode nach HEUSGHEM.

Ferner wird zur Oestrogenbestimmung noch die Titrierung in der Methode nach APPEL und die Diazotierung im Verfahren nach BOSCOTT angewandt. Auch die Methode nach CAROL, die sich der Infrarot-Spektrophotometrie bedient, ist hierbei zu erwähnen.

4.) Methode zur Gesamtbestimmung und Einzelbestimmung der Oestrogene

Bei den meisten Methoden können die 4 Oestrogene nur gemeinsam extrahiert und bestimmt werden. Daneben gibt es noch Methoden, welche sich nur auf die Bestimmung eines einzigen Oestrogens beschränken. Zu letzteren gehören die Methoden nach BANES, OBERSTE/LEHN und GIRARD, welche sich nur auf die Bestimmung des Oestrone beschränken und die Methode nach CAROL, mit welcher nur das Beta-Oestradiol bestimmt wird.

Einige wenige Methoden, mit denen die 4 Oestrogene zusammen gewonnen werden, enthalten bereits auch Schritte zur Trennung des gewonnenen Oestrogen-Gemisches in die einzelnen Oestrogene. Mit den Methoden von FRIEDGOOD/GARST und KELLER lässt sich eine Trennung der Oestrogene in schwach phenolisches (Oestriol) einerseits und stark phenolische (Oestron- u. Alpha- u. Beta-Oestradiol) andererseits durchführen.

Darüber hinaus gibt es einzelne Verfahren, die die getrennte Bestimmung der 4 Oestrogene quantitativ ermöglichen soll. Dazu gehören die Methoden nach BOSCOTT und SZEGO/SAMUELS.

Ausserdem gibt es noch reine Trennverfahren zur Trennung von Oestrogen-Gemischen wie z. B. die Methode nach GARST/NYC/MARON/FRIEDGOOD, die eine Trennung von Oestron, Oestriol und Oestradiol aus Gemischen ermöglicht. Ferner die Methode nach UMBERGER, die eine Trennung der 4 Oestrogene beschreibt und zugleich einen Weg speziell zur Trennung von Alpha- u. Beta-Oestradiol angibt.

Auch HAENNI hat eine Methode zur Trennung von Alpha- und Beta-Oestradiol mit einem eisenhaltigen Reagenz veröffentlicht.

B) Auswahl für die Klinik geeignet erscheinender Methoden

1.) Bestimmungsmethode nach KELLER

a) Wesen und Zweck der Methode

Bei der Auswahl der Bestimmungsmethoden bzw. Trennungsv erfahren erschien uns die Methode nach KELLER als sehr geeignet. Sie stellt eine Kombination von Einzelschritten entsprechend den neueren Forschungsergebnissen dar und liefert gleichzeitig Oestrogenextrakte von grosser Reinheit. Die 4 bekannten Oestrogene können mit ihr extrahiert werden und sie stellt ausserdem eine Trennungsmethode zur Trennung der starken von den schwach phenolischen Oestrogenen dar. Der mit ihr gewonnene stark phenolische Extrakt wurde als Ausgangspunkt zur weiteren Trennung der Oestrogene benutzt.

b) Methodik (chemisches Extraktionsschema)

Wie bei jeder chemischen Extraktionsmethode ist auch hier die Hydrolyse vorangestellt. Sie wird mit 10 Volumprozent konz. Salzsäure und halbstündigem Kochen unter dem Rückflusskühler ausgeführt. Hierdurch wird die Spaltung der Oestrogenschwefelsäure- bzw. Oestrogenzuckersäure-Verbindung in freies Oestrogen und der entsprechenden Säure erreicht, während die im Urin in geringen Mengen vorhandenen freien Oestrogene zerstört werden.

Die Extraktion erfolgt mit Äther nach dem sogenannten 4-Scheide-Trichter-System. Die Rohextrakte werden mit Natriumbicarbonat und Wasser gewaschen.

Aus diesen Rohextrakten erfolgt die Abtrennung der Androgene, der männlichen Sexualhormone, nach dem Verfahren von FRIEDGOOD und GARST, indem man die Oestrogene aus einem Tetrachlorkohlenstoff-Äthergemisch (10, 8 : 1) mit Kalilauge extrahiert.

Die Trennung des schwach- von den stark phenolischen Oestrogenen wird durch Adsorptionschromatographie über standardisierte, mit Aluminiumoxad gefüllten Säulen und anschliessendem Herauslösen der Stoffe mit den entsprechenden optimalen Lösungsmitteln (Chloroform für starkphenolische, Methanol für schwachphenolische Oestrogene) vorgenommen.

Bei der Originalmethode werden die Oestrogene mit Schwefelsäure gefärbt und fluorometrisch bestimmt. Aber auch die spektralfotometrische Bestimmung ist bereits angegeben worden und zwar durch BREITNER, dessen Methode wiederum eine Abwandlung der ALLENSchen Methode darstellt.

2.) Extraktionsmethode für Oestron nach GIRARD

a) Wesen und Zweck der Methode

Die Methode nach GIRARD ist eine spezielle Extraktionsmethode für das Oestron. Sie ist klinisch bisher noch nicht angewandt worden. In ihrer Originalanwendung wird sie zur Gewinnung von Oestron aus dem Harn schwangerer Stuten in grossem Massstab gebraucht. Sie macht sich die chemische Besonderheit der Ketogruppe des Oestrone zunutze und zwar in der Weise, dass diese Ketogruppe mit einem von GIRARD entwickelten Keton-Reagenz in wasserlösliche Verbindung tritt. Durch Ausschütteln in einem Zweiphasen-System (Wasser-Äther) geht diese in die wässrige Phase über. Dadurch lässt sie sich von den anderen organischen Substanzen, speziell von den anderen Oestrogenen, trennen. Durch Spaltung dieser Verbindung kann man dann das reine Oestron wieder gewinnen. In unserem Falle sollte die Methode dazu dienen, die Abtrennung des Oestrone, das man zusammen mit den beiden Oestradiolen in der KELLERSchen stark phenolischen Fraktion gewinnt, ermöglichen.

b) Methodik (chemisches Extraktionsschema)

Die Methodik gliedert sich in drei Arbeitsgänge und zwar

1.) die Koppelung des Oestrone an das Reagenz-T nach GIRARD.

Nach Auflösung eines Oestrogen-Rohextraktes in absolutem Alkohol und Zugabe von Eisessig und Reagenz-T wird das Gemisch unterm Rückflusskühler erhitzt, da die Reaktion nur in saurem Milieu und in der Hitze abläuft. Es bildet sich die Oestron-Reagenz-T-Verbindung.

2.) Überführung der Oestron-Reagenz-T-Verbindung in die wässrige Phase.

Die bei der Koppelung entstandene Oestron-Reagenz-T-Verbindung hat die Eigenschaft, nur in der Kälte und in neutralem Milieu beständig und wasserlöslich zu sein. Deshalb wird dieses Reaktionsgemisch durch eine andere vorbereitete Mischung (Wasser, Sodalösung und Eisstückchen) sofort abgekühlt und neutralisiert. Gleichzeitig gibt man Äther zu und schüttelt das Ganze aus. Die Oestron-Reagenz-T-Verbindung geht in die wässrige Phase über, während die anderen organischen Verbindungen, speziell die Oestradiole, im Äther aufgefangen und nach Abdampfung desselben aus diesem gewonnen werden.

3.) Spaltung der Oestron-Reagenz-T-Verbindung.

Die Oestron-Reagenz-T-Verbindung wird durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure wieder in ihre beiden Bestandteile zerlegt. Dadurch wird das Oestron in Freiheit gesetzt und mit Äther aus der wässrigen Phase extrahiert. Es bleibt dann nach Abdampfung des Äthers im Extrakt zurück.

3.) Methode zur getrennten Bestimmung von Alpha- u. Beta-Oestradiol in Gemischen nach UMBERGER und CURTIS

a) Wesen und Zweck der Methode

Sie stellt ein Teilergebnis der Untersuchungen der Oestrogen-Schwefelsäure-Färbung von UMBERGER und CURTIS dar. Diese zeigten, dass sich aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von Alpha- u. Beta-Oestradiol gegenüber Schwefelsäure niedriger Konzentration eine quantitative Trennung der beiden Oestradiole auf färbe- u. messtechnischer Basis durchführen lässt. Sie wird zur Trennung der Oestradiole, die nach Anwendung der Methode nach KELLER und GIRARD im Extrakt verbleiben, unserer Arbeit zugrundegelegt.

b) Methodik

1.) Bestimmung von Alpha-Oestradiol.

Der oestradiolhaltige Extrakt wird in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wird mit UMBERGER-Reagenz (Mischung von 30 vol. % Schwefelsäure und 20 vol. % n-Butyl-Alkohol) gefärbt. Da sich bei diesem Reagenz nur das Alpha-Oestradiol anfärbt, ergibt sich beim Messen dieser Farblösung die halbe Menge Alpha-Oestradiol.

2.) Bestimmung von Beta-Oestradiol.

Die andere Hälfte wird mit 73,5 %iger Schwefelsäure gefärbt. Man erhält dabei die Summe von Alpha- und Beta-Oestradiol der Extrakthälfte. Durch Subtraktion der gefundenen Menge Alpha-Oestradiol ergibt sich daraus die enthaltene Menge Beta-Oestradiol. Da es sich jeweils nur um Extrakt-Hälften handelt, muss die gefundene Menge verdoppelt werden.

IV.) EIGENE UNTERSUCHUNGEN ÜBER KLINISCHE BRAUCHBARKEIT

A) Nachprüfung von Ergebnissen über photometrisches Verhalten der Oestrogen-Reinsubstanzen sowie der Urochrome

Sie stellt eine Untersuchung schon bekannter Tatsachen über Oestrogenfärbung und -messung auf Fehlermöglichkeiten dar.

1.) Lichtabsorption der Oestrogen-Reinsubstanzen und deren Abhängigkeit

- a) Oestrogen-Schwefelsäure-Färbung und deren photometrische Messung.

Für die Bestimmung der Oestrogene wurde die spektralphotometrische Messung herangezogen, da für die Arbeit ein Beckman-Spektral-Quarz-Photometer zur Verfügung stand.

Für die photometrische Bestimmung ist es erforderlich, eine spezifische Oestrogen-Farblösung herzustellen. Dies ist mit verschiedenen Mitteln zu erreichen. Im allgemeinen werden starke Säuren oder deren Anhydride verwendet.

Die gebräuchlichste Säurefärbung ist die Färbung mit Schwefelsäure. Diese wurde den Untersuchungen zugrundegelegt.

Färbung

Es wurde schon früh beobachtet, dass beim Erhitzen der Oestrogene mit Schwefelsäure gelb-orange Färbungen mit grünlicher Fluoreszenz auftreten. Der Beweis für die Spezifität dieser Färbung wurde 1931 von KOBER geliefert.

Lichtabsorption der Farblösung

Durchstrahlt man eine Farblösung im Photometer mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, so wird dieses durch die Farblösung teilweise absorbiert. Der auftretende Helligkeitsunterschied in Bezug auf die durchstrahlte, als Vergleichslösung benutzte reine Schwefelsäure, löst über eine Photozelle einen Strom aus, dessen Intensität vom Photometer angezeigt wird. Der Ausschlag des Instrumentes entspricht also der Lichtabsorption der Farblösung.

Lichtabsorptionskurven

Durchstrahlt man eine Oestrogen-Farblösung mit Licht verschiedener Wellenlänge, so ergibt sich verschiedene Lichtab-

sorption. Trägt man die Lichtabsorption für die entsprechenden Wellenlängen auf ein Koordinatensystem auf, so erhält man eine für die Oestrogene typische Lichtabsorptionskurve. Sie weist im Bereich des sichtbaren Lichtes ein Maximum auf. Die Höhe dieses Maximum stellt ein Mass für die Menge des in der Farblösung enthaltenen Oestrogens dar.

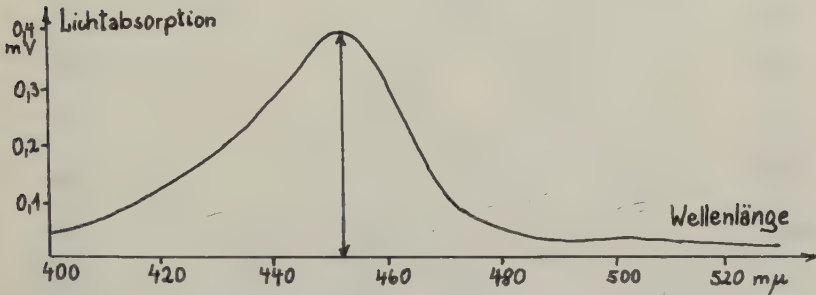


Abb. 1 Oestrogen-Lichtabsorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge.
Lichtabsorption von 15 Gamma Oestron im sichtbaren Bereich des Lichtes.

- b) Faktoren, von welchen die Lichtabsorptionsintensität abhängig ist.

Abhängigkeit von der Menge der Oestrogene

Färbt man steigende Mengen eines Oestrogens mit Schwefelsäure und trägt die erhaltenen Absorptionskurven auf dasselbe Koordinatensystem auf, so sieht man, dass sich die Kurven nur durch eine zunehmende Erhöhung des Maximum unterscheiden, entsprechend den gefärbten Oestrogenmengen. Es besteht also eine lineare Beziehung zwischen Menge des Oestrogens und Höhe der Lichtabsorptionsintensität.

Trägt man die in Abb. 2) erhaltenen Werte der Maxima in Beziehung zur Hormonmenge auf ein Koordinatensystem auf, so ergibt sich eine Gerade. Mit Hilfe einer solchen Geraden lässt sich aus einer bei der Messung gefundenen Lichtabsorption sofort die zugehörige Hormonmenge ablesen. Man nennt solche Kurven Eichkurven. Sie sind je nach Art des Hormons und der Färbetechnik verschieden und müssen für die entsprechenden Zwecke aufgestellt werden.

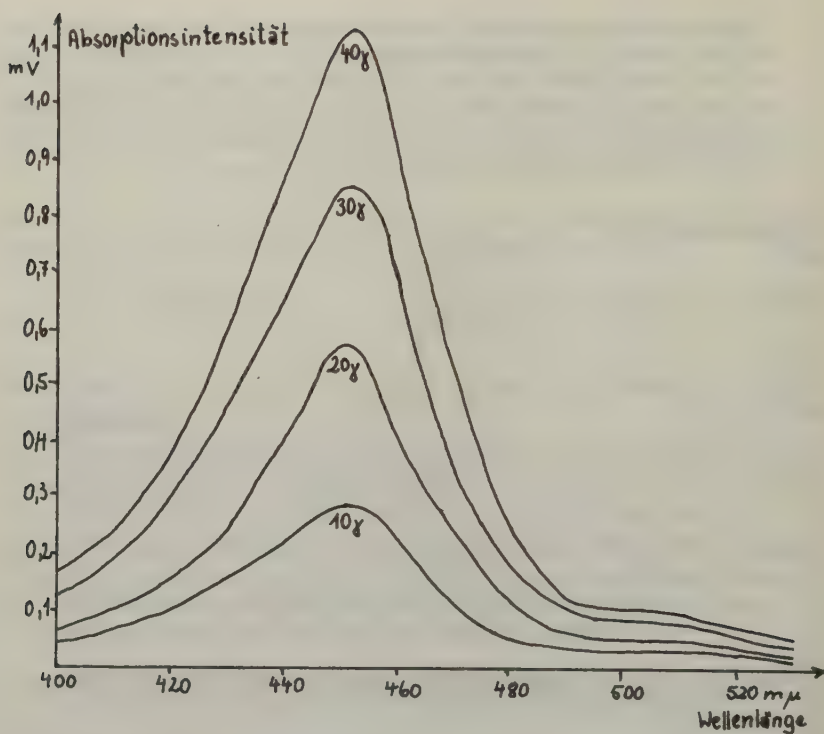


Abb. 2 Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Hormonmenge.

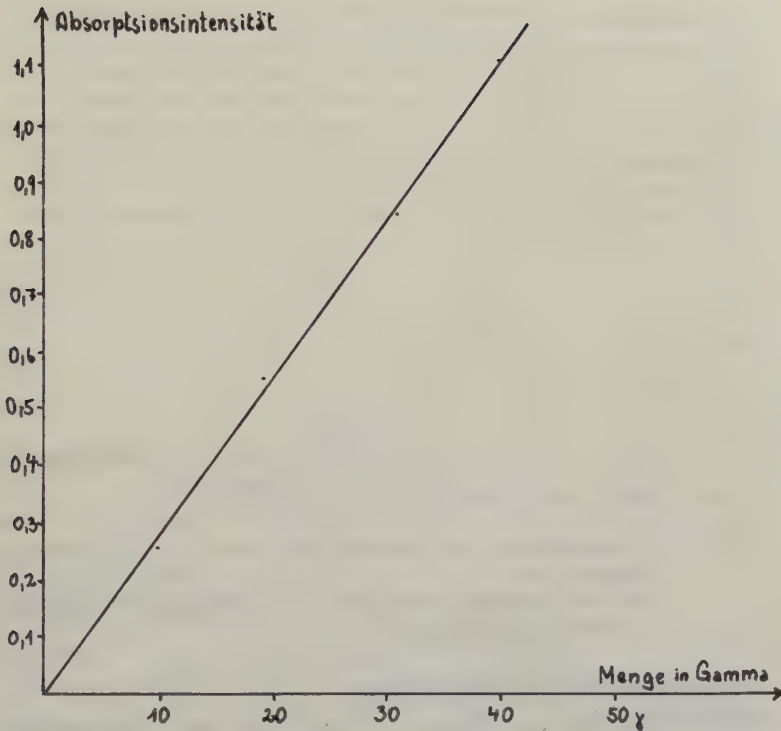


Abb. 3 Eichkurve für Oestron-Reinsubstanz bei Färbung mit 75 %iger Schwefelsäure u. Messung bei einer Wellenlänge von 455 mmy.

Abhängigkeit von der Art des Oestrogens

Färbt man gleiche Mengen der vier Oestrogene in Schwefelsäure, so zeigt sich, dass die Maxima der Lichtabsorption für die einzelnen Oestrogene verschieden gross sind und bei verschiedenen Wellenlängen liegen. Für jedes Oestrogen ist das Maximum der Lichtabsorption hinsichtlich Ort (Wellenlänge) und Höhe verschieden.

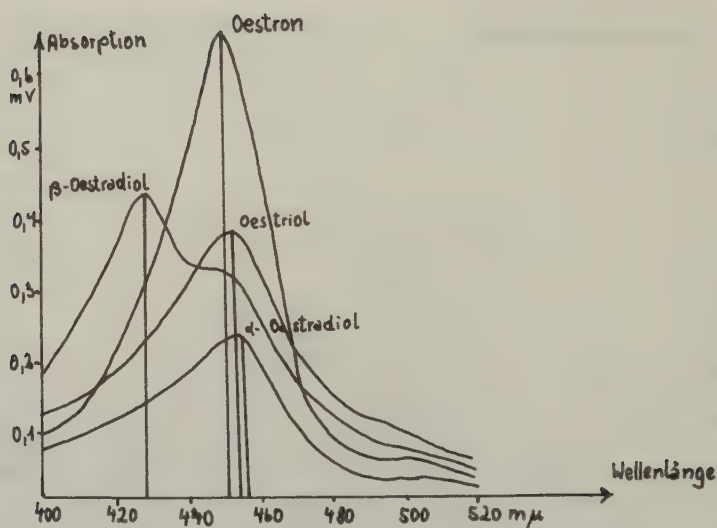


Abb. 4 Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Art des Oestrogens.
Die vier bekannten Oestrogene wurden mit 90 %iger Schwefelsäure gefärbt.

Abhängigkeit von der Färbezeit

Unter Färbezeit versteht man die Zeitdauer des Erhitzens der Farblösung im Wasserbad. Auch sie spielt für die Farbintensität eine grosse Rolle. Färbt man gleiche Mengen Hormon verschieden lang und trägt die Intensität der Lichtabsorption in Bezug auf die Färbezeit auf ein Koordinatensystem auf, so erkennt man, dass nach 3 Minuten bereits eine gewisse Höhe erreicht ist, die sich dann bis zur siebten Minute nur noch leicht steigert.

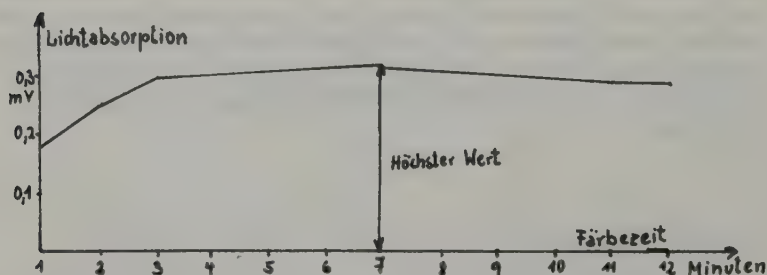


Abb. 5 Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Färbezeit.
Gleiche Mengen Oestron (10 Gamma) wurden verschieden lang (Abstand 1 Min.) gefärbt.

Abhängigkeit von der Konzentration der Schwefelsäure

Färbt man gleiche Mengen eines Oestrogens mit Schwefelsäure steigender Konzentration, so ersieht man aus den erhaltenen Absorptionskurven folgendes: das Maximum der Lichtabsorption unterscheidet sich entsprechend der Schwefelsäurekonzentration in Bezug auf Ort und Höhe. Das Maximum verschiebt sich mit steigender Konzentration zu den kleineren Wellenlängen und erreicht seinen höchsten Wert bei mittleren Wellenlängen.

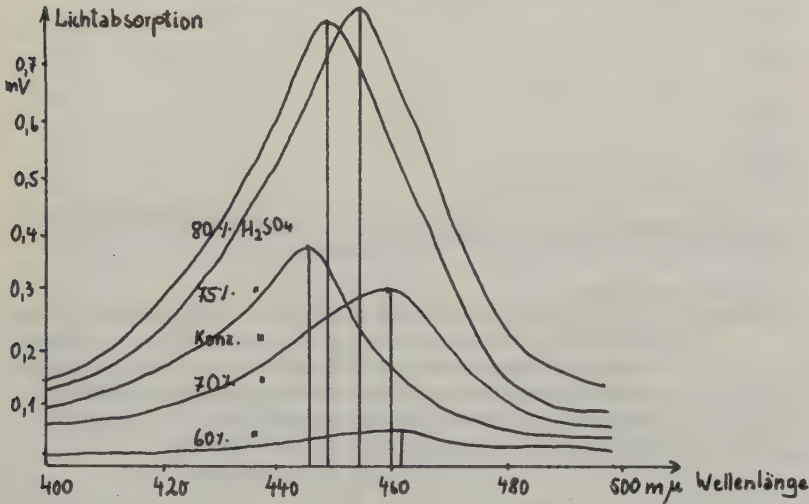


Abb. 6 Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Schwefelsäurekonzentration.

Gleiche Mengen Oestron (25 Gamma) wurden mit Schwefelsäuren steigender Konzentration gefärbt.

Trägt man die Lichtabsorptionsintensität der gefundenen Maxima in Bezug zur Konzentration der Schwefelsäure auf ein Koordinatensystem auf, so kann man aus dieser Kurve sofort erkennen, mit welcher Schwefelsäurekonzentration man die grösste Lichtabsorption, die sog. "Maximallichtabsorption", erzielen kann.

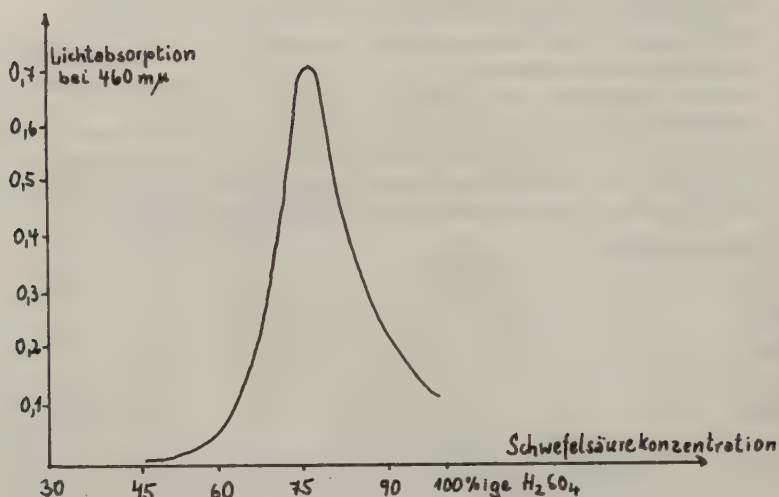


Abb. 7 Darstellung der Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Schwefelsäurekonzentration in Form einer Kurve. Gleiche Mengen Oestron (25 Gamma) wurden mit steigenden Schwefelsäurekonzentrationen gefärbt (wie in Abb. 6) und bei der Wellenlänge von 460 mμ gemessen.

2.) Bestimmung von Oestrogen-Reinsubstanz-Gemischen

a) Bestimmung einer Mischung zweier Oestrogene.

Will man eine Mischung von 2 Oestrogenen färben und photometrisch messen, so erhebt sich die Frage, mit welcher Schwefelsäurekonzentration dies auszuführen ist.

Bei der photometrischen Messung einer Oestrogenmischung ist es notwendig, mit einer Schwefelsäurekonzentration zu färben, bei welcher die Lichtabsorption für beide Oestrogene gleich gross ist. Denn nur in diesem Fall addiert sich die Lichtabsorption, also auch die Mengen der Oestrogene, in einem linearen, richtigen Verhältnis.

Für 1 Oestrogene lassen sich die Punkte gleicher Lichtabsorption leicht aus den Kurven, welche die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration der Schwefelsäure darstellen, ablesen. (Abb. 8). Trägt man die Absorptionskurven für beide Oestrogene in ein Koordinatensystem auf, so lassen sich aus den Schnittpunkten dieser Kurve sofort die Stellen gleicher Licht-

absorption bzw. die dafür erforderliche Schwefelsäurekonzentration ablesen.

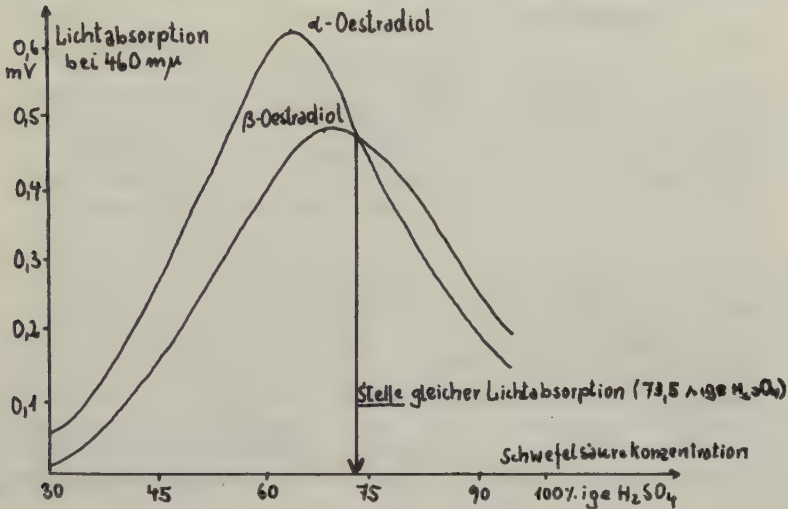


Abb. 8 Abhängigkeitskurven der Schwefelsäurekonzentration von zwei Oestrogenen zum Zwecke der Feststellung, bei welcher Konzentration die Lichtabsorption für beide Oestrogene gleich gross ist.

Leider erkennt man aber auch aus den oben da gestellten Kurven, dass die Schwefelsäure, bei welcher die Lichtabsorption gleich gross ist, nicht der Schwefelsäurekonzentration entspricht, bei der sich die Maximallichtabsorption für das einzelne Oestrogen ergibt. Bei der Bestimmung zweier Oestrogene leidet somit die Empfindlichkeit der Messung.

b) Bestimmung einer Mischung von drei Oestrogenen

Trägt man die Lichtabsorptionskurven, die die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Schwefelsäurekonzentration darstellen, für die 3 Oestrogene auf dasselbe Koordinatensystem auf, so zeigt sich aus den Schnittpunkten der Kurven, wie in Abb. 9) dargestellt ist, dass es für 3 Oestrogene keine Schwefelsäurekonzentration gibt, bei welcher für alle 3 die Lichtabsorption gleich gross ist.

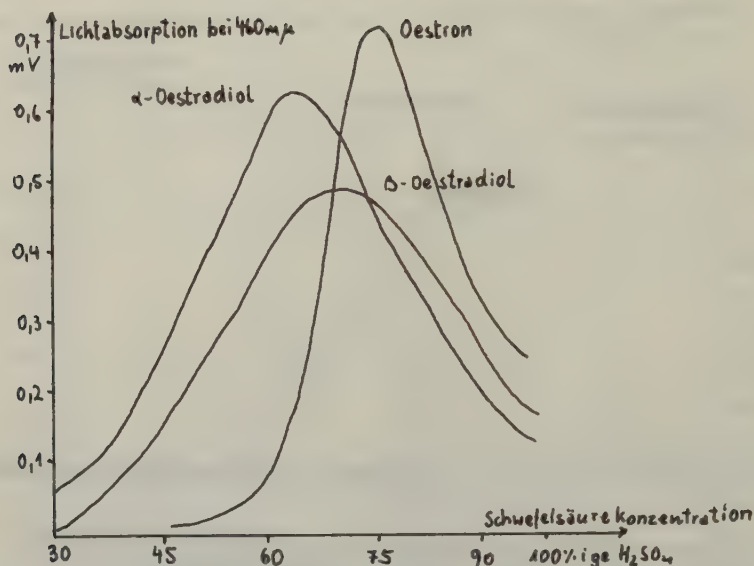


Abb. 9 Lichtabsorptionskurven in Abhängigkeit von der Schwefelsäurekonzentration von drei Oestrogenen.

Färbt man in diesem Falle mit einer Schwefelsäurekonzentration, so würden sich die einzelnen Lichtabsorptionen nicht in linearem Verhältnis addieren. Ist eine grössere Menge von Oestrogen mit geringerer Lichtabsorption vorhanden, so ergibt sich bei der Messung derselbe Wert wie für eine geringere Menge Oestrogen mit stärkerer Lichtabsorption.

Bei der Bestimmung aller 4 Oestrogene wirkt sich dieser Umstand noch entsprechend stärker aus.

Es erscheint wichtig, auf diese Tatsache als Fehlerquelle bei der Gesamtoestrogenbestimmung hinzuweisen.

3.) Untersuchung der Extraktverunreinigungen (Urochrome) an hormonfreien Extrakten

a) Wesen der Urochrome.

Die mit den chemischen Bestimmungsmethoden gewonnenen Extrakte sind trotz häufiger Reinigungen immer noch mit Substanzen vermischt, die dem chemischen Bau um Steroide, Pigmente und Abbauprodukte aus den verschiedensten Stoffwechselvorgängen im Körper, die ein Gemisch von meist einfacheren che-

mischen Stoffen teils bekannter, teils unbekannter Natur darstellen und die dem Harn seine Eigenfarbe verleihen. Sie werden unter der Sammelbezeichnung **Urochrome** zusammengefasst.

b) Gewinnung der Urochromextrakte

Die Gewinnung der in den Extrakten vorkommenden Urochrome geschieht in sehr einfacher Weise. Man verwendet hormonfreien Urin (Kastraten- bzw. Kinderurin), den man entsprechend den verschiedenen Oestronbestimmungsmethoden aufarbeitet. In den erhaltenen Extrakten verbleiben dann nur die Urochrome.

c) Lichtabsorption der Urochrome.

Versetzt man diese so gewonnenen Extrakte mit Schwefelsäure und bestimmt die Lichtabsorption bei verschiedenen Wellenlängen, so ergeben sich für die Urochrome typische Absorptionskurven, bei denen die Maxima im UV-Licht liegen, während im sichtbaren Bereich des Lichtes nur noch ein Rest von Lichtabsorption vorhanden ist.

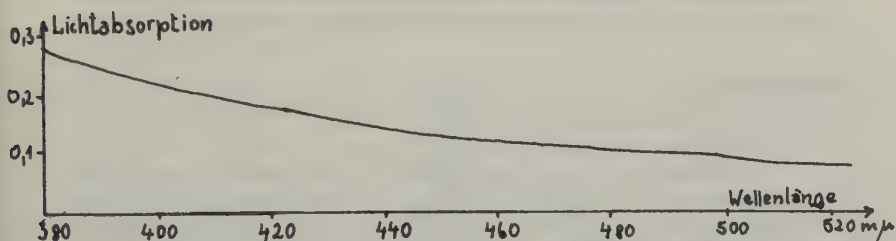


Abb. 10 Lichtabsorption der Urochrome im sichtbaren Bereich des Lichtes.

d) Untersuchung der mengenmässigen Ausscheidung der Urochrome.

Um über die mengenmässige Ausscheidung der Urochrome näheren Aufschluss zu erhalten, wurden hormonfreie Urinmengen verschiedener Tage entsprechend der KELLERSchen Methode extrahiert und die Lichtabsorptionskurven ermittelt. Aus den Kurven geht hervor, dass die Urochrome in wechselnder Menge ausgeschieden werden.

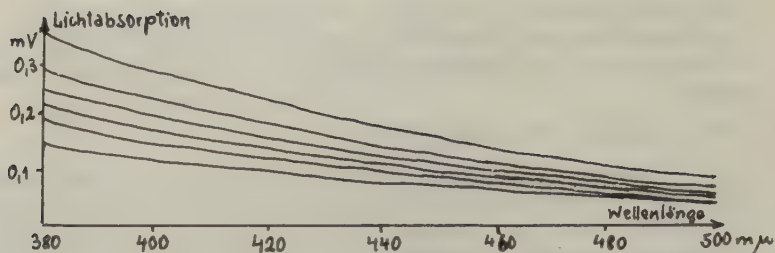


Abb. 11 Lichtabsorptionskurven von hormonfreien Urinextrakten (Urochrome) verschiedener Tage, wobei der höchste und der niedrigste Wert sowie einige Mittelwerte herausgegriffen wurden.

e) Beeinflussung der Oestrogenmessung durch die Urochrome.

Gibt man solchen Urochromextrakten Hormon-Reinsubstanzen zu, und bestimmt die Lichtabsorptionskurve, so sieht man, dass sich die Lichtabsorptionskurve in Beziehung zur Reinsubstanzkurve der Urochromlichtabsorption überlagert.

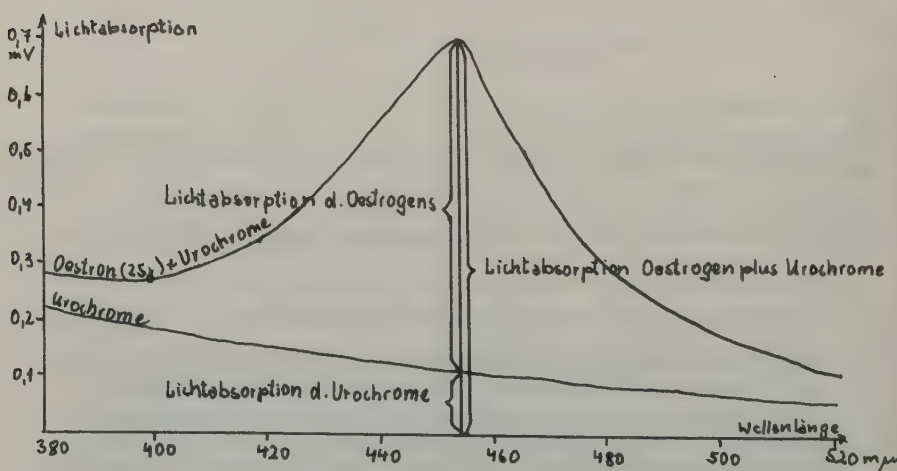


Abb. 12 Lichtabsorptionskurve von reinen Urochromen und Lichtabsorptionskurve von derselben Menge Urochrome plus Oestrogen-Reinsubstanz (25 Gamma Oestron).

Die Höhe des Maximums entspricht der Lichtabsorption der Urochrome plus der Oestrogene. Da aber nun, wie oben gezeigt wird,

Urochrome in wechselnder Menge in den Extrakten vorhanden sind, so liefert das Maximum keinen absoluten Wert für die tatsächlich vorhandene Menge. Es stellt immer die Summe der Lichtabsorption der Oestrogene plus einer unbekannten Lichtabsorption der Urochrome dar. Das bedeutet, dass sich für die photometrische Oestrogenbestimmung eine schwankende Grundlinie ergibt. Diese schwankende Grundlinie, welche durch die Urochrome hervorgerufen wird, setzt der Bestimmung der Oestrogene grosse Schwierigkeiten entgegen. Sie ist eine weitere Möglichkeit zur Fehlbestimmung.

f) Beeinflussung der Oestrogen-Lichtabsorption durch die Urochrome

Es wurde schon früh beobachtet, dass die Urochrome die Hormonlichtabsorption beeinflussen und zwar im Sinne einer Erniedrigung. Diese Tatsache ist als sogen. "Quenchingeffekt" bekannt.

Bei der Nachprüfung des Quenchingeffektes ergab sich darüber hinaus, dass es wahrscheinlich in Abhängigkeit von der Qualität des Urochroms auch zu gelegentlicher Erhöhung der Lichtabsorption kommt.

Hormonfreie Urinmengen verschiedener Tage wurden extrahiert und in zwei Hälften geteilt. Der eine Teil wurde mit, der andere Teil ohne Hormonzusatz gefärbt und gemessen. Es ergab sich eine durchschnittliche Erniedrigung der Lichtabsorption, die auf die Menge umgerechnet ungefähr 2 Gamma ausmacht. Aus den erhaltenen Kurven ist ferner zu sehen, dass es zweimal zu einer Erhöhung der Lichtabsorption gekommen ist.

Daraus ersieht man, dass die Urochrome eine der grössten Fehlerquellen für die Messung der aus dem Urin gewonnenen Oestrogene darstellen. Erstens im Sinne einer schwankenden Grundlinie und zweitens durch wechselnde Beeinflussung der Oestrogenlichtabsorption.

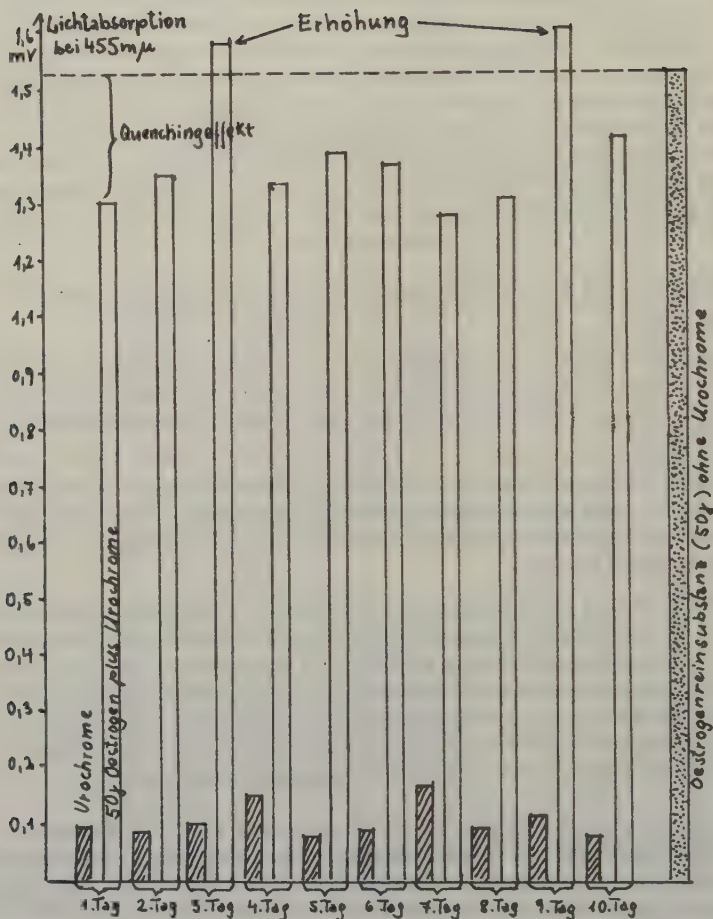


Abb. 13 Darstellung des Quenchingeffektes.

Urochrome von 10 aufeinanderfolgenden Tagen wurden halbiert, zu der einen Hälfte wurden jeweils 50 Gamma Oestron-Reinsubstanz zugefügt und beide Hälften bei der Wellenlänge von 455 mmy gemessen. Im Vergleich dazu wurde die Lichtabsorption von 50 Gamma Oestron-Reinsubstanz bei derselben Wellenlänge eingetragen.

B) Untersuchung der drei ausgewählten Methoden

Bei nachstehenden Untersuchungen sollte nicht der genaue chemische Mechanismus und der chemische Ablauf der Methoden untersucht werden, sondern man wollte lediglich die Verlässlichkeit, die Verluste, die Verlustbreite und die Störungen bei den Methoden feststellen, um dadurch Aufschluss über die klinische Brauchbarkeit zu erhalten, soweit dies mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln möglich war. Vom Standpunkt des Nichtchemikers aus schien dieses Problem durch 3 verschiedene Wege der Untersuchung lösbar.

1.) Prüfung der Methoden an bekannten Mengen Reinsubstanzen (Modellversuch)

Mit diesen Modellversuchen sollte der richtige Ablauf und die Verlässlichkeit der Methoden festgestellt werden.

Als Untersuchungsmedium wurde nicht Urin, sondern destilliertes Wasser verwendet. Die Oestrogenreinsubstanzen wurden erst nach der am Anfang des Extraktionsverfahrens stehenden Hydrolyse in ihrer Reinsubstanzlösung zugegeben, da freie Oestrogene durch die Hydrolyse zerstört werden. Dann extrahierte man entsprechend der Vorschrift der Methode und prüfte die Extrakte durch photometrische Bestimmung auf ihren Oestrogengehalt.

Die Oestrogene erschienen bei den Methoden nach KELLER und GIRARD in den richtigen Extrakten. Auch konnte bei der Methode nach UMBERGER der richtige Ablauf bestätigt werden, denn das eine Oestradiol lässt sich ohne Störung durch das andere einwandfrei nachweisen. Damit war die Verlässlichkeit bzw. der richtige Ablauf der Methoden bestätigt.

2.) Prüfung durch Parallelversuche

Nachdem die Verlässlichkeit der Methoden im Modellversuch bestätigt worden war, konnte nun darangegangen werden, die Verluste und deren Schwankungsbreite festzustellen. Dies geschah mittels Parallelversuche

Unter Parallelversuchen verstehen wir die Durchführung einer Reihe von Modellversuchen (in unserem Falle 30 pro Methode) auf die gleiche Art und Weise wie in Punkt 1), wobei die zugegebene Oestrogenmenge jeweils gleich gross ist. Aus den erhaltenen Werten, die sich bei den einzelnen Methoden ergaben, konnten die Verlust und deren Schwankungsbreite festgestellt werden.

Dabei ergab sich für die Methode nach KELLER im Durchschnitt ein Verlust von 30 % Oestrogen ± 10 Gamma Schwankungsbreite, bei der Methode nach GIRARD 30 % Verlust ± 5 Gamma Schwankungsbreite. Bei der Methode nach UMBERGER ergab sich, da es nur eine reine Methode zur getrennten Bestimmung ist, praktisch kein Verlust bei einer Schwankungsbreite von ± 1 Gamma, die durch die Messung bedingt ist. Im übrigen siehe zusammenfassende Prüfungsergebnisse Seite 24, Pkt. D.

3.) Prüfung durch Wiedergewinnung bekannter Oestrogen-Rein- substanzen aus Leerurin

Zur Untersuchung der im Urin vorhandenen und die Bestimmung störenden Faktoren wurden Wiedergewinnungsversuche in Form von Parallelversuchen aus Leerurin angesetzt. Dies geschieht, indem man einem hormonfreien Urin (Kastraten- oder Kinderurin) eine bekannte Menge Oestrogene nach der Hydrolyse in Reinsubstanz zugibt und entsprechend der Methoden extrahiert. Aus den erhaltenen Ergebnissen sollte die Beeinträchtigung der Oestrogenbestimmung durch die verunreinigenden Substanzen festgestellt werden.

Sämtliche Oestrogen-Extrakte waren durch Urochrome verunreinigt. Im Verhältnis zu den Parallelversuchen aus destilliertem Wasser ergab sich ein durchschnittlicher Mehrverlust von 2 Gamma, der auf den Quenching-Effekt zurückzuführen sein dürfte.

Bei einer einzelnen Oestrogenbestimmung kann, wie in Pkt. IV, A, Nr. 3.) f gezeigt wird, gelegentlich eine Erhöhung des Wertes durch die Urochrome bis zu + 3 Gamma eintreten. Da durch den Quenching-effekt eine maximale Erniedrigung von 6 Gamma eintreten kann, so ergibt sich eine zusätzliche Schwankungsbreite von + 3, - 6 Gamma. Diese Schwankungsbreite kommt zu der durch das Extraktionsverfahren hervorgerufenen Schwankungsbreite hinzu, was den Wert der Einzelbestimmung stark herabsetzt.

C) Kombination der drei Methoden für die Einzelbestimmung der Oestrogene aus ihren Mischungen

1.) Modifizierung der Methode nach GIRARD

Nach der Prüfung der Einzelmethode war das nächste Ziel der Arbeit die quantitative Einzelbestimmung der Oestrogene aus ihren Gemischen. Dieses Ziel sollte durch Hintereinanderschalten der drei Methoden nach KELLER/GIRARD/UMBERGER verwirklicht werden.

Die KELLERSche Methode liefert die Oestrogene quantitativ getrennt in schwach phenolisch (Oestriol) und stark phenolisch (Oestron, Alpha-Oestradiol und Beta-Oestradiol). Mit Hilfe der Methode nach GIRARD sollte das Oestron aus dem stark phenolischen Extrakt abgetrennt werden.

Dazu war es zunächst erforderlich, die GIRARDSche Methode, die auf Extraktion von Oestron aus dem Harn von schwangeren Stuten in grossem Masstab zugeschnitten ist, für die Extraktion der in den KELLERSchen stark phenolischen Extrakt erscheinenden, geringen Mengen Oestron anwendbar zu machen.

Dies war durch entsprechende Reduzierung der Reaktionsmittel und durch einige Veränderungen zur Vereinfachung des technischen Vorganges möglich.

Da die KELLERSche Methode einen Zeitaufwand von 8 Stunden, und die Methode nach GIRARD einen von 3 Stunden erfordert, ergibt sich allein für diese beiden Methoden eine Arbeitszeit von 11 Stunden. Da ein solcher Zeitaufwand nicht tragbar erschien, wurden Versuche unternommen, die Reaktionszeiten der einzelnen Arbeitsgänge der Methode nach GIRARD zu verkürzen.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass bereits eine Koppelungszeit von einer Viertelstunde genügt, um das Oestron vollständig an das GIRARD-Reagenz-T zu koppeln gegenüber einer halben Stunde lt. Angabe der Methode nach GIRARD.

Anschliessend wurde versucht, die Zeitdauer, die zur Hydrolyse d.h. zur Spaltung der Oestron-Reagenz-T-Verbindung erforderlich ist und die nach Angabe 2 Stunden beträgt, zu verkürzen. Das geschah in der Weise, dass man die Hydrolyse zwar auch mit konzentrierter Salzsäure, aber in kochendem Wasserbad unter Rückflusskühlung ausführte. Dadurch konnte die erforderliche Zeit von 2 Stunden auf 5 Minuten verkürzt werden, sogar - wie aus der unten dargestellten Abbildung 15 hervorgeht - unter Verminderung der Verluste.

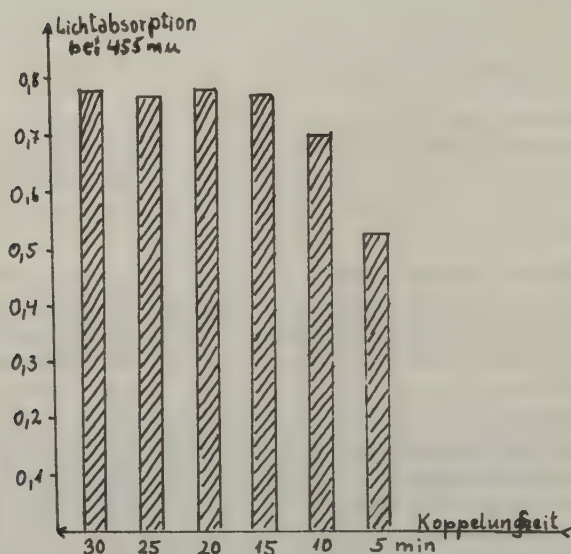


Abb. 14 Verkürzung der Koppelungszeit.

Die Koppelungszeit, die mit einer halben Stunde angegeben wird, wurde jeweils um 5 Minuten verkürzt und die Lichtabsorption bei 455 mμ bestimmt.

Es wurden jeweils gleiche Testmengen von 25 Gamma Oestron verwendet.

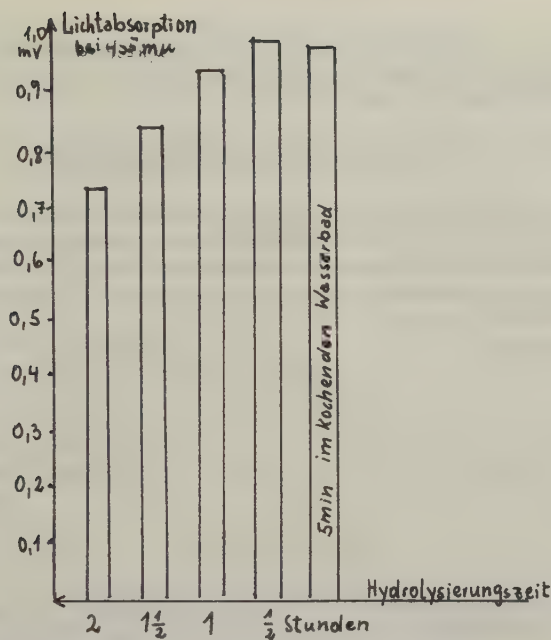


Abb. 15 Verkürzung der Hydrolysierungszeit (Hydrolyse zur Spaltung der Oestron-Reagenz-T-Verbindung).

Die Hydrolyse wurde jeweils um 1/2 Stunde verkürzt und einmal mit einer Zeitdauer von nur 5 Minuten im kochenden Wasserbad ausgeführt. Testmengen jeweils 50 Gamma Oestron.

Damit hatte man einen tragbaren Zeitaufwand für die Methode nach GIRARD erreicht.

2.) Hintereinanderschaltung der drei Methoden

Diese verkürzte Methode wurde nun der KELLERschen Methode angeschlossen und mit ihr konnte nun das Oestron aus der KELLERschen stark phenolischen Fraktion abgetrennt werden. Damit war der Schritt der Abtrennung des Oestrone vollzogen. Das Oestron und auch die beiden Oestradiole erschienen in den richtigen Phasen.

Wie aus den Modellversuchen hervorging, war es mit der Methode nach GIRARD möglich, das gesamte Oestron vollständig von den Oestradiolen abzutrennen und zwar ohne verbleibende Reste. Die Oestradiole wurden von der Methode nach GIRARD nicht beeinträchtigt.

Die jetzt noch in Mischung verbliebenen beiden Oestradiole konnten entsprechend der Methode nach UMBERGER und CURTIS schnell und quantitativ getrennt werden.

3.) Prüfung der kombinierten Methode

Auch hier wurde wie in Punkt B) die Verlässlichkeit und der richtige Ablauf der Methode im Modellversuch und die Schwankungs- u. Verlustbreite durch Parallelversuche untersucht sowie die Fehlermöglichkeiten durch Störfaktoren durch Wiedergewinnungsversuche aus dem Leerurin festgestellt.

D) Prüfungsergebnisse

1.) Verlust und Fehlerbreite der einzelnen Methoden

Die Parallelversuche ergaben folgende Ergebnisse hinsichtlich Verluste und Schwankungsbreite der Methoden:

<u>Methode</u>	<u>Verlust</u>	<u>Schwankungsbreite</u>
KELLER	30 %	+ - 10 Gamma
GIRARD	30 %	+ - 5 Gamma
UMBERGER u. CURTIS (reine photometrische Trennungs- methode)	0 %	+ - 1 Gamma, bedingt dch. die Messung
Kombination der Meth. KELLER/GIRARD/UM- BERGER	70 %	+ - 20 Gamma.

2. Fehlerquellen

Bei alleiniger Anwendung der KELLERschen Methode ist zunächst die Fehlerquelle anzuführen, die durch die Gesamtoestrogenbestimmung auftritt, wie in IV A 2 gezeigt wurde.

An zweiter Stelle steht die Störung der Urochrome, die durch kein bekanntes Verfahren umgangen werden kann, sodass es durch die verschiedene Beeinflussung der Hormone durch die Urochrome zu erheblichen Fehlbestimmungen kommen kann, wobei der Fehler infolge wechselnder Wirkung der Urochrome auf die Oestrogenlichtabsorption nicht konstant bleibt.

Da der mit der Methode nach GIRARD gewonnene Extrakt Urochrome enthält, ist die gleiche Fehlerquelle wie bei der Methode nach KELLER vorhanden. Ausserdem ist darauf zu achten, dass das GIRARD-Reagenz immer in einwandfreiem Zustand verwendet wird, da es licht- und luftunbeständig ist und deshalb manchmal Störungen bei der Bestimmung auftreten.

Auch die verbleibenden Oestradiole sind durch Urochrome verunreinigt, was als Anlass zu Fehlbestimmungen gibt. Bei der UMBERGER-Methode an sich könnten höchstens Messfehler Anlass zu Fehlbestimmungen geben.

Bei der kombinierten Methode KELLER/GIRARD/UMBERGER kommt auch die Störung durch die Urochrome in Betracht. Die Extrakte enthalten geringere Mengen von Urochromen, da die Gesamturochrome bei der Methode auf die verschiedenen Extrakte verteilt werden. Von 100 Gamma im Urin enthaltenen Oestrogenen werden nur 30 Gamma

Oestrogen wieder gewonnen bei einer Schwankungsbreite von ± 20 Gamma Oestrogen wieder gewonnen bei einer Schwankungsbreite von ± 20 Gamma, woraus sich im ungünstigsten Fall eine Wiedergewinnung von 10 Gamma, im günstigsten Fall 50 Gamma ergibt. Bei Umrechnung auf die tatsächlich vorhandene Menge muss der Wert mit 3,3 multipliziert werden. Dabei multipliziert sich auch der Fehler um das Dreifache.

Bei so grossem Verlust und so grosser Schwankungsbreite ist damit die Brauchbarkeit der Ergebnisse sehr in Frage gestellt.

3.) Zeitverbrauch und Schwierigkeitsgrad

Der Zeitverbrauch bei der KELLERSchen Methode liegt bei ungefähr 8 Stunden, der sich bei gleichzeitiger Bestimmung von mehreren Untersuchungen auf 5 Stunden verkürzen lässt. Der Analysengang ist sehr langwierig und erfordert eine in chemischen Analysen erfahrene Fachkraft. Es ist ferner ein gut eingerichtetes Laboratorium Voraussetzung und bei der Spektralphotometrischen Bestimmung ein Beckmann-Spektral-Photometer.

Der Zeitaufwand bei der Methode nach GIRARD, der ursprünglich 3 Stunden betrug, konnte auf eine halbe Stunde verkürzt werden. Hinsichtlich Schwierigkeitsgrad und technische Voraussetzung gilt dasselbe wie bei der Methode nach KELLER.

Bei UMBERGER u. CURTIS beträgt der Zeitaufwand ungefähr 20 Minuten und ist ohne grosse Schwierigkeit und technische Voraussetzung durchzuführen.

Die kombinierte Methode erfordert den grössten Zeitaufwand, da sich dieser aus dem Zeitaufwand der drei Methoden ergibt. Diese kombinierte Methode zur getrennten Oestrogenbestimmung benötigt also einen Zeitaufwand von ungefähr 10 Stunden.

Der Schwierigkeitsgrad bleibt der gleiche wie bei den einzelnen Methoden.

4.) Kostenaufwand bei den einzelnen Methoden

Die Kostspieligkeit für die KELLERSche Methode ist infolge des grossen Materialverbrauchs an teuren, zum Zwecke der Analyse bereiteten hochqualifizierten Chemikalien sehr gross. Dazu kommt noch der grosse Arbeitsaufwand. Wenn man von der Amortisation der dazu erforderlichen teuren Geräte absieht, dürfte der reine Unkostenbetrag DM 50.-- pro Untersuchung liegen.

Bei der Methode nach Girard liegt der Kostenaufwand aus denselben Gründen sehr hoch. Hierbei verteuert sich die Bestimmung durch das speziell herzustellende Keton-Reagenz-T. Da es aber gelungen

ist, die Methode von 3 Stunden auf eine halbe Stunde zu verkürzen, dürfte ungefähr ein Kostenaufwand von DM 30, -- anzunehmen sein.

Die Methode nach UMBERGER u. CURTIS erfordert nur geringen Material- u. Arbeitsaufwand, da es sich ja nur um eine photometrische Trennung handelt.

Bei der kombinierten Methode errechnet sich der Kostenaufwand aus den 3 einzelnen Methoden. Er liegt demnach bei ungefähr DM 80, --.

ZUSAMMENFASSUNG

Am Schluss der Arbeit sei nochmals erwähnt, dass es nicht darauf ankam, Oestrogengehalt in Serie mit bekannten Methoden zu bestimmen, sondern eine kritische Untersuchung schon bekannter Methoden in Bezug auf Zuverlässigkeit, Fehlerbreite und klinische Brauchbarkeit durchzuführen.

Zunächst sei gesagt, dass die chemischen Extraktionsmethoden einen grossen Aufwand an Material, Zeit und technischen Voraussetzungen erfordern. Sie stellen langwierige Prozeduren dar, die nicht immer einfach auszuführen sind. Der Arbeitsaufwand und der Aufwand an Chemikalien steht in keinem Verhältnis zu der Genauigkeit der Ergebnisse.

Es wurde gezeigt, dass die Gesamt-Oestrogenbestimmung, wie sie bei der KELLERSchen Methode zur Anwendung kommt, aufgrund der verschiedenen Lichtabsorption der einzelnen Oestrogene eine erhebliche Fehlerquelle darstellt.

Ferner setzen die Urochrome der Messung der Oestrogene grosse Schwierigkeiten entgegen und zwar sowohl durch Erniedrigung der Oestrogen-Lichtabsorption als auch durch gelegentliche Erhöhung. Sie sind in sämtlichen Extrakten vorhanden, sodass sie sich auch bei der Bestimmung der Einzeloestrogene störend auswirken.

Die Verluste bei den chemischen Bestimmungsmethoden liegen um 30 % bei einer Schwankungsbreite von ± 10 Gamma. Bei der kombinierten Methode zur Bestimmung der einzelnen Oestrogene liegen sie bei 70 % bei einer Schwankungsbreite von ± 20 Gamma.

Hinsichtlich der klinischen Ansprüche sind der Grad der Genauigkeit und der Reinheit mit diesen nicht in Einklang zu bringen. Bei geringeren Ansprüchen ist es möglich, eine ungefähre Schätzung der Oestrogene bzw. des Oestrogenkomplexes vorzunehmen.

Der Versuch, Reinsubstanzen und Einzelsubstanzen zu erhalten und zu messen, ist bei den täglich zur Ausscheidung kommenden Mengen nur schwer möglich und wird mit grossen Substanzverlusten erkauf.

Wenn wir das Resultat ziehen, so sind die biologischen Methoden wegen ihrer Einfachheit doch noch klinisch gleichwertig und wegen des geringeren Arbeitsaufwands und der geringeren Kosten empfehlenswerter.

Am Ende dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank dem ehemaligen Direktor der I. Universitätsfrauenklinik, Herrn Professor Dr. H. EYMER, sowie seinem Nachfolger, Herrn Professor Dr. W. BICKENBACH, für die Überlassung der Arbeit.

Auch dem Herrn Privatdozenten Dr. H. WAGNER sei mein herzlichster Dank für seine tatkräftige Unterstützung ausgesprochen.

C SCHRIFTTUM

- Allen: Jour. clin. Endocrinol. 10/1 71-83 (1950)
- Appel: Federat. Proc. 3 148 (1948)
- Aschheim-Zondek: Klin. Wochenschrift 6:1322-1324 (1927)
- Bachmann-Petit: J. Biol. Chem. 138:689 (1941)
- Banes: Jour. Clin. Endocrinol. 52:183 (1948)
- Bates u. Cohen: Endocrinol. 47: 1668 181, 181-192 (1947)
- Boscott: Nature Lond. 164:140 (1949)
- Breitner u. Eichstätter: Ärztl. Forsch. 10:457-462 (1954)
- Breitner: Gynäcol. April (1954)
- Carol: J. Amer. Pharm. Ass 37:173 (1948)
- Cohen u. Bates: J. Cli. Endocrinol. 7:701 (1947)
- Eichberger u. Käser: Gynaecol. Vol. 147, 128/220 (1949)
- Finkelstein: Biochem. J. 28, 1603 (1947)
- Friedgood u. Garst: Rec. Progress. Res. 2:31 (1948)
- Garst, Nyc, Maron,
Friedgood: Rec. Progress. Res. 4:14 (1949)
- Girard u. Sandulesco: Helv. chim. Akta, Mai (1936)
- Heftmann: Science 11:571 (1950)
- Heusghem: J. Biol. Chem. 13:192 (1949)
- Hoffmann u. Eichberger: Gynaec. 133 (1952)
- Jailer: Jour. Clin. Endocrinol. 41:198 (1947)
- Keller: Gynaec. 136 (1953)
- Kleiner: J. Biol. chem. 138:83 (1948)
- Kober: Biochem. J. (Brit.) 239:209 (1931)
- Lipschütz u. Poch: Compte Rend. Soc. de Biol. 11:856 (1932)
- Marrian: Biochem. J. 24:435 (1930)
- Martius-Bickenbach: Lehrb. d. Gebhlf. (1952)
- Oberste-Lehn: Endocrinology 41:198 (1947)
- Papanicolau: Proc. Soc. expr. Biol. a. Med. 22:106, 436
- Slomwithe, Ekman, Engel, J. Biol. chem. 164/
Nathanson, Pincus u. Carlo:

- Slomwithe, Ekman, Engel,
Nathanson, Pincus u. Carlo: J. Biol. chem. 164:621 (1946)
- Stimmel: Biochem. J. 28:1603 (1946)
- Umberger u. Curtis: Federat. Proc. 7, 261 (1948)
- Szego u. Samuels: Proc. Soc. Exp. 43:263 (1940)

LEBENS LAUF

- Daten:** Geboren am 17.1.1931 in Kaaden/CSR als Sohn des Ingenieurs Josef Gamisch.
- Schulbildung:** Deutsche Volksschule ab 1937 in Prag
ab 1939 Volksschule in Berlin
ab 1941 Oberschule in Berlin
- Nach der Vertreibung 1946
ab 1947 Oberschule in Miesbach bis zum Abitur 1951.
- Ab 1951 Studium der Medizin an der Universität München.
- 1953 ärztliche Vorprüfung.
- Am 12.12.1956 med. Staatsexamen an der Münchner Universität.

